

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-91887

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/64		8114-4B		
// (C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:785)				

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-251964	(71)出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22)出願日	平成3年(1991)9月30日	(72)発明者	河島 洋 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内
		(72)発明者	秋元 健吾 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内
		(72)発明者	山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1
		(72)発明者	清水 昌 京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14
		(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外4名)

(54)【発明の名称】 ジホモーγ-リノレン酸及びこれを含有する脂質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 ジホモーγ-リノレン酸及びこれを含有する脂質の新規な製造方法を提供する。

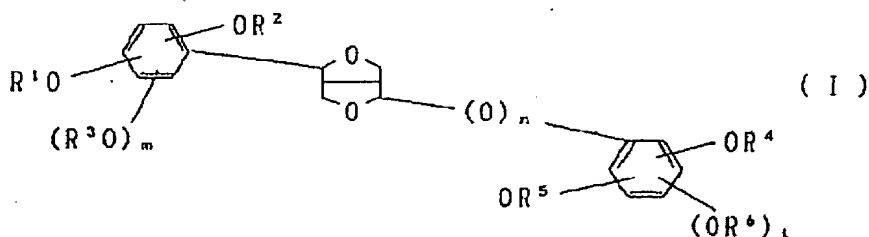
【構成】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を培養して、ジホモーγ-リノレン酸またはジホモーγ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモーγ-リノレン酸又はそれを含有する脂質を採取することを特徴とするジホモーγ-リノレン酸又はそれを含有する脂質の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を培養して、ジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモγーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモγーリノレン酸の製造方法。

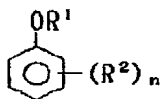
【請求項2】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を培養し、ジホモγーリノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項3】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、Δ5不飽和化酵素阻害剤を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にΔ5不飽和化酵素阻害剤*



(式中、R¹, R², R³, R⁴, R⁵、及びR⁶はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1～3のアルキル基、あるいはR¹とR²、及び/又はR⁴とR⁵は一緒になってメチレン基もしくはエチレン基を表し、そしてn, m, lは0又は1を表す)で表わされるジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン誘導体、ピペロニルブトキサイド、クルクミン、クルクミン、又は次の一般式(I)：

【化2】



(式中、R¹は低級アルキル基を示し、R²は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。R²が複数ある場合には、複数のR²は同一であっても異なってもよい。nは0～5の整数を示す。)で表わされる化合物であることを特徴とする請求項3又は4記載のジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項6】 前記ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン誘導体がセサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ

〔3.3.0〕オクタン、2,6-ビス-(3メトキシ

*を添加してさらに培養することにより、ジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてジホモγーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモγーリノレン酸の製造方法。

【請求項4】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、Δ5不飽和化酵素阻害剤を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にΔ5不飽和化酵素阻害剤を添加してさらに培養し、ジホモγーリノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項5】 前記Δ5不飽和化酵素阻害剤が、次の一般式(I)：

【化1】

-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタンであることを特徴とする請求項5記載のジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【請求項7】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独でまたは組み合せて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を添加してさらに培養することにより、ジホモγーリノレン酸を含有する脂質またはジホモ

3

γ-リノレン酸を生成せしめ、そしてジホモγ-リノレン酸を採取することを特徴とするジホモγ-リノレン酸の製造方法。

【請求項8】 アラキドン酸生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独でまたは組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を添加してさらに培養し、ジホモγ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするジホモγ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はアラキドン酸（以下、ARAと称する）生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を利用した発酵法によるジホモγ-リノレン酸（以下、DGLAと称する）またはこれ含有する脂質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 DGLA（8，11，14-エイコサトリエン酸）は魚油、海藻等の構成脂肪酸のひとつとして存在することが知られている。しかしながら、その含量はわずかであるため単離精製品はたいへん高価なものとなっている。比較的高い生産効率をもつ生産方法としては、DGLA生産能を有する微生物を使用した発酵法による製造方法（特開昭63-14696号公報）や、さらにその生産性を向上させるために不飽和脂肪酸を培地に添加したり（特開昭64-47384号、特開昭64-47385号公報）、またゴマ油やクルクミン、各種植物の抽出物、セサミン、エピセサミン等を培地に添加する方法（特開平1-243992号、特開平2-268690号、特開平3-72892号、特開平3-49688号公報）が知られている。

【0003】 また、必須脂肪酸が生体を与える作用に関しては様々な研究が行われているが、DGLAとARAの両者から生ずるエイコサノイドの作用は互いに拮抗することが多いことが知られている。DGLA由来のプロスタグランジン1群は血小板凝集抑制作用、血管拡張作

4

用、気管支拡張作用、抗炎症作用等を有することが知られているが、DGLAを油脂の形で食品等として経口摂取してこれらの作用を発揮するためには、拮抗作用のあるARAが低含量であるDGLA含有油脂が最も好ましい。さらに、DGLA含有油脂からDGLAを精製する際にもARAの含量の低い油脂を用いた方が操作が容易で好ましい。このようにARAが低含量であるDGLA含有油脂の開発が強く望まれているが、その製造方法はこれまで知られていない。

10 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明は、安価な常用の培地のみを用いて簡便に効率よくDGLA及びDGLA含有油脂を製造する方法及びΔ5不飽和化酵素阻害剤等の添加を併用して、ARA含量の低いDGLA含有油脂を製造する方法を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の目的を達成するため種々研究した結果、ARAを生産する能力を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下または欠失した微生物を常用の培地で培養するとARAの前駆体であるDGLAを大量に蓄積すること、並びに、この微生物をΔ5不飽和化反応阻害剤を添加した培地で培養するとさらにARAの割合が下がり、DGLAの割合が上昇することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 従ってこの発明は、ARA生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を培養して、DGLAまたはDGLAを含有する脂質を生成せしめ、そしてDGLAを採取することを特徴とするDGLAの製造方法；及びARA生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を培養し、DGLA含有する脂質を採取することを特徴とするDGLA含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

【0007】 この発明はさらに、ARA生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、Δ5不飽和化酵素阻害剤を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にΔ5不飽和化酵素阻害剤を添加してさらに培養することにより、DGLAまたはDGLA含有する脂質を生成せしめ、そしてDGLAを採取することを特徴とするDGLAの製造方法；及びARA生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、Δ5不飽和化酵素阻害剤を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にΔ5不飽和化酵素阻害剤を添加してさらに培養し、DGLA含有する脂質を採取することを特徴とするDGLA含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

【0008】 この発明はさらに、ARA生産能を有し、かつΔ5不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、ゴ

マ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独でまたは組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を添加してさらに培養することにより、DGLAまたはDGLAを含有する脂質を生成せしめ、そしてDGLAを採取することを特徴とするDGLAの製造方法；及びARA生産能を有し、かつ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失した微生物を、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独でまたは組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物、タラゴン (Tarragon) の抽出物、イノンド種子 (Dill Seed) の抽出物、パセリ (Parsley) の抽出物、ウコン (Turmeric) の抽出物、ナツメグ (Nutmeg) の抽出物を添加してさらに培養し、DGLAを含有する脂質を採取することを特徴とするDGLAを含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

【0009】

【具体的な説明】本発明においては、ARA生産能を有し、かつ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失した微生物であれば、すべて使用できる。ARA生産能を有する微生物としては、例えばモルティエラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフトラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、クラドスポリウム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトリラ (*Rhodotorula*) 属またはエントモフトフ (*Entomophthora*) 属に属する微生物を挙げることができる。モルテ

イエレラ属では例えば、モルティエラ・エロンダカ (*Mortierella elongata*)、モルティエラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 等のモルティエラ亜属に属する菌株を挙げることができる。このような微生物は、ARA生産能を有する微生物に突然変異操作を行い、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性が低下又は欠失した変異株を誘発させることによって得られる。

10 【0010】突然変異操作としては、放射線 (X線、 γ 線、中性子線) や紫外線を照射したり、高熱処理を行ったり、また微生物を適当なバフファース中などに懸濁し、変異源を加えて一定時間インキュベート後、適当に希釈して寒天培地に植菌し、変異株のコロニーを得るといった操作を行うこともできる。変異源としては、ナイトロジェンマスタード、メチルメタンサルホネート (MM S)、N-メチル-N'-ニトロソ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等のアルキル化剤や、5-ブロモウラシル等の塩基類似体や、マイトマイシンC等の抗生物質や、6-メルカプトプリン等の塩基合成阻害剤や、プロ

20 フラビン等の色素類や、4-ニトロキノリン-N-オキシド等のある種の発癌剤や塩化マンガン、重クロム酸カリウム、亜硝酸、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、ホルムアルデヒド、ニトロフラン化合物類などを挙げることができる。また使用する微生物は、生育菌体 (菌糸など) でも良いし、孢子でも良い。

30 【0011】モルティエラ属の変異株としては例えば、本発明者らが誘導した突然変異株モルティエラ・エロンダカ SAM1860 (微工研菌条第3589号) を使用することができる。本発明に使用される変異株を培養するためには、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固形培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。

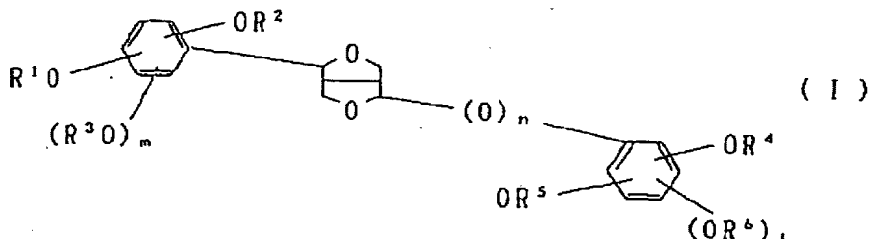
40 【0012】窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンステイプリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。

50 【0013】これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限しない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。又、培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好

ましくは6~9として通気攪拌培養、振とう培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~10日間行う。

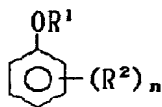
【0014】固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50~100重量%の水を加えたふすま、もみがら、米ぬか等を用い、5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において、3~14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

【0015】また、本発明におけるDGLAの蓄積を促進するため、ARAの基質を培地に添加することができる。基質としては、テトラデカン、ヘキサデカン、オクタデカン等の炭化水素、テトラデカン酸、ヘキサデカン*



【0017】(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1~3のアルキル基、あるいは R^1 と R^2 、及び/又は R^4 と R^5 は一緒になってメチレン基もしくはエチレン基を表し、そしてn, m, Lは0又は1を表す)で表わされるジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン誘導体、ピペロニルブトキサイド、クルクミン、又は次の一般式(II)：

【化4】



【0018】(式中、 R^1 は低級アルキル基を示し、 R^2 は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。 R^2 が複数ある場合には、複数の R^2 は同一であっても異なってもよい。n 0~5の整数を示す。)で表される化合物等が挙げられ、これらは単独で又は適宜組合わせて用いることができる。

【0019】前記ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン誘導体としては、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン等を挙げることができ、これらを単独で、又はいずれか2種類以上を組合わせて使用すること

*酸、オクタデカン酸等の脂肪酸、又はその塩(例えばナトリウム塩またはカリウム塩)、脂肪酸エステル、又は脂肪酸を構成成分として含む油脂(例えばオリーブ油、大豆油、綿実油、ヤシ油)等を挙げることができるが、これらに限られるものではない。

【0016】さらに本発明は、よりARAの含量が低いDGLA含有油脂を生成せしめるため、種々の $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤の存在下で培養することによりDGLAを蓄積せしめることを特徴としている。この場合、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤として、次の一般式(I)：

【化3】

【0020】 $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害剤の一つである前記ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン誘導体を得る方法として次の手順で行うことができる。まず、前記ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン誘導体を主成分とする抽出物を胡麻油から得るには、胡麻油とは実質的に非混和性であり且つ該誘導体を抽出・溶解することができる種々の有機溶剤を用いて抽出・濃縮すること

【0021】このような有機溶剤として、例えばアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、メタノール、エタノール等を挙げることができる。前記ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン誘導体を主成分とする抽出物を得るには、胡麻油と上記の溶剤のいずれかとを均一に混合した後、低温において静置し、遠心分離等の常法に従って相分離を行い、溶剤画分から溶剤を蒸発除去することにより得られる。

【0022】さらに具体的には、胡麻油を2~10倍、好ましくは6~8倍容量のアセトンに溶かし、-80℃で一晩放置する。その結果油成分が沈澱となり、濾過により得た濾液から有機溶剤を留去して、該誘導体を主成分とする抽出物が得られる。あるいは、胡麻油を熱メタノール又は熱エタノールで混合した後、室温において静置し、溶剤画分から溶剤を蒸発除去することにより得られる。

【0023】さらに具体的には、胡麻油を2~10倍、好ましくは5~7倍容量の熱メタノール(50℃以上)又は熱エタノール(50℃以上)で激しく混合し抽出する。室温に静置あるいは遠心分離等の常法に従って相分離を行い、溶剤画分から溶剤を留去して、該誘導体を主

成分とする抽出物が得られる。また超臨界ガス抽出も利用できる。

【0024】この抽出物より、各々の前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を得るためには、抽出物をカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶、蒸留、液々向流分配クロマトグラフィー等の常法に従って処理することにより目的とする化合物を単離すればよい。さらに具体的には、逆相カラム（5C18）、溶離液にメタノール／水（60：40）を使って、上記抽出物を高速液体クロマトグラフィーで分離し、溶媒を留去した後、得られた結晶をエタノールで再結晶化することでセサミン、エピセサミン、セサミノール、エピセサミノール等の各前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を得られる。

【0025】用いる胡麻油は精製品でもよく、また胡麻油の製造過程で脱色工程前のいずれの粗製品でもよく更に、胡麻種子あるいは胡麻粕（脱脂胡麻種子、残油分8～10%）であってもよい。この場合、胡麻種子あるいは胡麻粕を必要により破碎した後、任意の溶剤、例えば胡麻油からの抽出について前記した溶剤を用いて常法により抽出することができる。抽出残渣を分離した後、抽出液から蒸発等により溶剤を除去することにより抽出物が得られる。

【0026】このように調製された胡麻種子抽出物、胡麻粕抽出物からはセサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-（3, 4-メチレンジオキシフェニル）-6-（3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル）-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、2, 6-ビス-（3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル）-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、又は2-（3, 4-メチレンジオキシフェニル）-6-（3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ）-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタンの前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体が同様の手法で得られる。

【0027】なお細辛から得られるセサミンも胡麻種子、胡麻粕及び胡麻油より得られるセサミンと同等の効果を有する。さらに、胡麻油製造過程の副産物からも前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を得ることができる。なお、前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体の精製法及び抽出物を得る方法は、これに限られるものではない。さらに前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体及び該誘導体を主成分とする抽出物は、胡麻油、胡麻粕、及び胡麻種子から得たものに限定したわけではなく、該誘導体を含む天然物をすべて使用できるのは明かであり、例えば五加皮、桐木、白果樹皮、ヒハツ、細辛等を挙げることができる。

【0028】また、合成により前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を得る方法としては、以

下のものが挙げられる。例えば、セサミン、エピセサミンについては、Berozaらの方法〔J. Am. Chem. Soc. 78, 1242 (1956)〕で合成することができる他、ピノレシノール（一般式Iにおいて $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = R^5 = CH_3$, $n = m = L = 0$ ）はFreundenbergらの方法〔Chem. Ber., 86, 1157 (1953)〕によって、シリングレシノール（一般式Iにおいて $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = R^3 = R^5 = R^6 = CH_3$, $n = 0$, $m = L = 1$ ）はFreundenbergらの方法〔Chem. Ber., 88, 16 (1955)〕によって合成することができる。又、前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体は、 Δ^5 不飽和化酵素の特異的な阻害活性を有している限りその吸収を高めるために例えば、配糖体等の形で使用することができる。

【0029】また前記一般式(II)で表される化合物の具体例としては、アニソール、メトキシフェノール、ジメトキシベンゼン、ジエトキシベンゼン、トリメトキシベンゼン、メトキシトルエン、トリブチルヒドロキシアニソール（BHA）、オイゲノール等が挙げられる。

【0030】さらにDGLAの蓄積を高めるために培地に添加可能なものとして、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶媒によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、五加皮の抽出物、桐木の抽出物、白果樹皮の抽出物、ヒハツの抽出物、細辛の抽出物や香辛性植物、例えばタラゴン（Tarragon）、イノンド種子（Dill Seed）、パセリ（Parsley）、ウコン（Turmeric）、ナツメグ（Nutmeg）等からの抽出物を使用することができる。例えばジクロロメタン、エタノール、メタノール、エチルエーテル等を用いて調製することができる。

【0031】添加物の量はおよそ次の通りである。胡麻油又は落花生油、あるいはこの両者の総添加量は培地に対して0.001～10重量%、好ましくは0.5～10重量%である。胡麻油の抽出物を添加する場合、その添加量は培地に対して $3 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-1}$ 重量%である。また、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール等の前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を添加する場合その量（これらの2種類以上を組み合わせる場合はその合計量）は、培地に対して $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1}$ 重量%である。

【0032】これらの添加物類は、生産微生物を接種する前又はその直後の培地に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。

【0033】このようにして培養して、菌体内にDGLAを大量に含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体から、例えば、次のようにしてDGLAの採取を行う。

【0034】培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は

十分水洗いし、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によって良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のDGLAを含有した脂質が得られる。

【0035】また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

【0036】上記のようにして得られた脂質中には、DGLAが脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらの直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えばジホモγ-リノレン酸メチルとして分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸（これらも、DGLAのエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、DGLAのメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5～10%、BF₃-メタノール10～50%等により、室温にて1～24時間処理するのが好ましい。

【0037】前記の処理液からジホモγ-リノレン酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物中には、目的とするジホモγ-リノレン酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等が含ま

表 1

脂肪酸	菌 株	
	モルティエラ・ アルピナ IFO8568	変異株 SAM1860
パルミチン酸	0.79	0.77
オレイン酸	0.76	0.74
DGLA	0.20	1.27
ARA	1.42	0.46
総脂肪酸	3.95	4.30
乾燥菌体 (g/L)	12.8	13.7

数値は培地 (L) 当りの生成量 (g)

れている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からジホモγ-リノレン酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々向流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

【0038】こうして単離されたジホモγ-リノレン酸メチルからDGLAを得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

10 【0039】また、DGLAをそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2～3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

【0040】次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. グルコース2%及び酵母エキス1%を含む培地 (pH6.0) 100mlを500mlエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO8568 (比較例) 及び変異株SAM1860 (実施例) を別々に培地に1白金耳接種し、レシプロシェーカー (110rpm) により28℃で6日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥した。これにより、IFO8568から1.28g、SAM1860から1.37gの乾燥菌体を得た。

30 【0041】これらの菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いるBligh & Dyerの抽出法によって総脂質を抽出したところ、IFO8568から505mg、SAM1860から530mgの脂質が得られた。これらの脂質を無水メタノール-塩酸 (95:5) を用いて20℃にて3時間処理することによってメチルエステル化し、エーテルで抽出してIFO8568から417mg、SAM1860から454mgの脂肪酸メチルを得た。得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

【0042】

13

【0043】表1から明らかなように、変異株SAM1860は、DGLAをARAに変換する Δ 5不飽和化活性が親株と比べて著しく低下しており、ARAの前駆体であるDGLAを大量に蓄積することが認められた。なお、得られた脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィーによって分離し、ビスホモγ-リノレン酸メチル画分を分取したものについて、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、質量分析、NMR分析を行ったところ、いずれも市販の標準サンプルと一致した。

【0044】実施例2. グルコース2%及び酵母エキス10 1%を含む培地 (pH6. 0)、グルコース4%及び酵母*

表 2

培 養 温 度	グルコース 濃 度	乾燥菌体 (g/L)	培地当りの生成量 (g/L)	
			DGLA	ARA
28℃	2 %	11. 0	1. 33	0. 49
	4 %	15. 5	2. 49	0. 99
	8 %	20. 5	3. 72	1. 27
20℃	2 %	11. 8	1. 51	0. 50
	4 %	16. 4	3. 22	1. 02
	8 %	20. 0	4. 10	1. 20

【0047】表2から明らかなように、グルコースが増すとARAの前駆体であるDGLAが大量に蓄積した。一方、ARAの生産はいずれも、DGLAの約30~40%に抑えられていた。また、28℃及び20℃いずれも良好なDGLA生産が認められた。

【0048】実施例3. グルコース2%、酵母エキス1%、Tween 20 0. 2%及び種々の炭化水素、脂肪酸ナトリウム、脂肪酸エステル又は油脂0. 5%を※30

表 3

添 加 物	乾燥菌体 (g/L)	DGLA (g/L)	ARA (g/L)
ヘキサデカン	18. 1	1. 89	0. 55
オクタデカン	18. 3	1. 80	0. 50
オレイン酸ナトリウム	15. 5	1. 40	0. 48
リノール酸ナトリウム	14. 8	1. 40	0. 49
オレイン酸メチル	18. 1	1. 99	0. 56
リノール酸メチル	18. 7	2. 15	0. 60
オリーブ油	17. 9	1. 92	0. 59
綿実油	18. 5	1. 98	0. 59
ヤシ油	18. 4	1. 88	0. 58
無添加	13. 0	1. 25	0. 40

【0050】標準培地に炭化水素、脂肪酸ナトリウム、脂肪酸エステル又は油脂を添加した場合、DGLAの生成量は無添加区に較べ、12~72%向上した。

【0051】実施例4. グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0. 1%を含む培地 (pH6. 0) 51を10 50

14

*エキス1%を含む培地 (pH6. 0) 並びにグルコース8%及び酵母エキス1%を含む培地 (pH6. 0) 100mlを500mlエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。

【0045】変異株モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM1860を別々に培地に1白金耳接種し、レシプロシェーカー (110rpm) により28℃または20℃で10日間振盪培養した。培養後、実施例1と同様にして得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表2にその結果を示す。

【0046】

※含む培地 (pH6. 0) 20mlを100ml容マイヤーに入れ、120℃で20分間殺菌した。変異株モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM18601白金耳を接種し、ロータリーシェーカー (110rpm) により28℃で7日間培養した。得られた菌体について、実施例1と同様にして得られた脂肪酸メチルをガスクロマトグラフィーで分析した。表3にその結果を示す。

【0049】

1ジャーファーマンダに入れ、120℃で40分間殺菌後、変異株モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) SAM1860の前培養液200mlを接種した。28℃、通気量0. 5v.v.mで7日間通気攪拌培養し、殺菌した33%グルコース溶液150mlを2, 3, 4お

15

よび5日目に添加した。

【0052】得られた湿菌体960g(乾燥重量126g)について、実施例1と同様の操作により、総脂質74.8g混合脂肪酸メチル70.2gを得た。これをガスクロマトグラフィーで分析したところ、DGLA含量は総脂肪酸の30%、DGLA生成量は培地1リットル当たり4.0g、乾燥菌体1g当たり165mgであった。

【0053】実施例5。グルコース4%、酵母エキス1%を含む培地(pH6.0)100mlを500mlエルレンマイヤーフラスコに入れたもの4本のうち、2本には、セサミン(2,6-ビス-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-シス-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン)を15重量%溶解させた大豆油0.*

表 4

菌 株	M. アルピナ IFO8568 IS-4		変異株 SAM1860	
	無	有	無	有
セサミン含有大豆油の添加	無	有	無	有
DGLA対ARAの比	0.15	1.17	5.04	12.3
総脂肪酸(g/L)	11.1	11.8	12.0	11.9
乾燥菌体(g/L)	23.8	24.2	24.6	24.1
DGLA生産量(g/L)	0.39	1.87	2.45	2.93

【0056】表4から明らかなように、IFO8568ではΔ5不飽和化酵素阻害剤であるセサミンを添加して培養してもDGLA対ARAの比は1.17までしか上昇しないが、Δ5不飽和化活性の低下した変異株SAM1860をさらにΔ5不飽和化酵素阻害剤セサミン存在下で培養することによって同比は12.3にまで上昇することがわかった。また、セサミンの添加は総脂肪酸量及び乾燥菌体重量には影響を与えないことも確かめられた。

【0057】この結果から、「ビスホモγ-リノレン酸及びこれを含有する脂質の製造方法」と題する特許出願(特開平1-243992号)の明細書に記載されていると同様の効果によって、ARAの生産が抑制されてDGLAの大量生産が起こり、DGLA対ARAの比が上昇することは明らかであり、セサミン以外に、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である

16

*5mlずつをそれぞれ加え、残り2本には大豆油0.5mlずつをそれぞれ加え、120℃で20分間殺菌した。

【0054】モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IS-4(比較例)及び変異株SAM1860(実施例)をそれぞれの培地に別々に1白金耳接種し、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。培養24時間目に、セサミン含有大豆油を添加した培養には、滅菌した上記セサミン含有大豆油0.5mlをそれぞれ添加し、大豆油を添加した培地には滅菌した大豆油0.5mlをそれぞれ添加した。培養後、実施例1と同様にして得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表4にその結果を示す。

【0055】

有機溶剤によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の溶剤抽出物、セサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、タラゴン(Tarragon)の抽出物、イノンド種子(Dill Seed)の抽出物、パセリ(Parsley)の抽出物、ウコン(Turmeric)の抽出物、ナツメグ(Nutmeg)の抽出物も、ARAの生産を抑制しDGLAの大量生産を起こして、DGLA対ARAの比が上昇することは明らかである。

【手続補正書】

【提出日】平成4年8月5日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

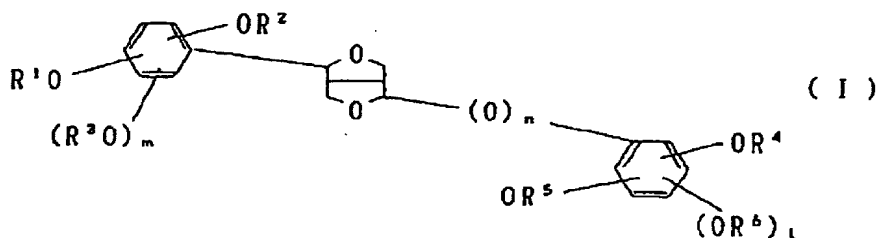
【補正対象項目名】請求項5

【補正方法】変更

【補正内容】

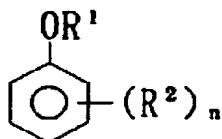
【請求項5】 前記Δ5不飽和化酵素阻害剤が、次の一般式(I):

【化1】



(式中、 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 、及び R^6 はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1～3のアルキル基、あるいは R^1 と R^2 、及び／又は R^4 と R^5 は一緒になってメチレン基もしくはエチレン基を表し、そして n , m , l は0又は1を表す)で表わされるジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン誘導体、ピペロニルブトキサイド、クルクミン、又は次の一般式(II)：

【化2】



(式中、 R^1 は低級アルキル基を示し、 R^2 は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。 R^2 が複数ある場合には、複数の R^2 は同一であっても異なってもよい。 n は0～5の整数を示す。)で表わされる化合物であることを特徴とする請求項3又は4記載のジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項6

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項6】 前記ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン誘導体がセサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ〔3.3.0〕オクタンであることを特徴とする請求項5記載のジホモγーリノレン酸またはジホモγーリノレン酸を含有する脂質の製造方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】

【具体的な説明】本発明においては、ARA生産能を有し、かつ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失した微生物であれば、すべて使用できる。ARA生産能を有する微生物としては、例えばモルティエセラ (*Mortierella*) 属、コニディオボラス (*Conidiobolus*) 属、フィチウム (*Pythium*) 属、フィトフトラ (*Phytophthora*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、クラドスポリウム (*Cladosporium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ロードトルラ (*Rhodotorula*) 属またはエントモフトラ (*Entomophthora*) 属に属する微生物を挙げることができる。モルティエセラ属では例えば、モルティエセラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*)、モルティエセラ・エキシグア (*Mortierella exigua*)、モルティエセラ・ヒドロフィラ (*Mortierella hygrophila*)、モルティエセラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 等のモルティエセラ属の属する菌株を挙げることができる。このような微生物は、ARA生産能を有する微生物に突然変異操作を行い、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素活性が低下又は欠失した変異株を誘発させることによって得られる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】モルティエセラ属の変異株としては例えば、本発明者らが誘導した突然変異株モルティエセラ・アルピナ SAM1860 (微工研菌条第3589号) を使用することができる。本発明に使用される変異株を培養するためには、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固形培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】(式中、 R^1 は低級アルキル基を示し、 R^2 は水酸基、アルキル基、アルコキシ基、アルケニル基、オキシアルキル基を示す。 R^2 が複数ある場合には、複数の R^2 は同一であっても異なってもよい。 n は0~5の整数を示す。) で表される化合物等が挙げられ、これらは単独で又は適宜組合わせて用いることができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体としては、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン等を挙げることができ、これらを単独で、又はいずれか2種類以上を組み合わせ使用することができる。またこれらの立体異性体あるいはラセミ体も合わせて使用することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】このように調製された胡麻種子抽出物、胡麻粕抽出物からはセサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタンの前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体が同様の手法で得られる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】また、合成により前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体を得る方法としては、以

下のものが挙げられる。例えば、セサミン、エピセサミンについては、Berozaらの方法〔J. Am. Chem. Soc. 78, 1242 (1956)〕で合成することができる他、ピノレシノール(一般式Iにおいて $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = R^5 = CH_3$, $n = m = L = 0$)はFreundenbergらの方法〔Chem. Ber., 86, 1157 (1953)〕によって、シリンガレシノール(一般式Iにおいて $R^1 = R^4 = H$, $R^2 = R^3 = R^5 = R^6 = CH_3$, $n = 0$, $m = L = 1$)はFreundenbergらの方法〔Chem. Ber., 88, 16 (1955)〕によって合成することができる。又、前記ジオキサビシクロ〔3. 3. 0〕オクタン誘導体は、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の特異的な阻害活性を有している限りその吸収を高めるために例えば、配糖体等の形で使用することができる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】また前記一般式(II)で表される化合物の具体例としては、アニソール、メトキシフェノール、ジメトキシベンゼン、ジエトキシベンゼン、トリメトキシベンゼン、メトキシトルエン、t-ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、オイゲノール等が挙げられる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正内容】

【0040】次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. グルコース2%及び酵母エキス1%を含む培地(pH6. 0)100mlを500mlエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IFO8568(比較例)及び変異株SAM1860(実施例)を別々に培地に1白金耳接種し、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で6日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、凍結乾燥した。これにより、IFO8568から1. 28g、SAM1860から1. 37gの乾燥菌体を得た。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】表1から明らかなように、変異株SAM1860は、DGLAをARAに変換する $\Delta 5$ 不飽和化活性が親株と比べて著しく低下しており、ARAの前駆体であるDGLAを大量に蓄積することが認められた。なお、得られた脂肪酸メチルをカラムクロマトグラフィー

によって分離し、ジホモγ-リノレン酸メチル画分を分取したものについて、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、質量分析、NMR分析を行ったところ、いずれも市販の標準サンプルと一致した。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正内容】

【0051】実施例4. グルコース2%、酵母エキス1%、大豆油0.1%を含む培地(pH6.0)5lを10lジャーファーマンターに入れ、120℃で40分間殺菌後、変異株モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) SAM1860の前培養液200mlを接種した。28℃、通気量0.5v.v.mで7日間通気攪拌培養し、殺菌した33%グルコース溶液150mlを2, 3, 4および5日目に添加した。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】得られた湿菌体960g(乾燥重量126g)について、実施例1と同様の操作により、総脂質74.8g、混合脂肪酸メチル70.2gを得た。これをガスクロマトグラフィーで分析したところ、DGLA含*

*量は総脂肪酸の30%、DGLA生成量は培地1リットル当たり4.0g、乾燥菌体1g当たり165mgであった。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正内容】

【0054】モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) I FO8568 (比較例) 及び変異株SAM1860(実施例)をそれぞれの培地に別々に1白金耳接種し、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で7日間振盪培養した。培養24時間目に、セサミン含有大豆油を添加した培養には、滅菌した上記セサミン含有大豆油0.5mlをそれぞれ添加し、大豆油を添加した培地には滅菌した大豆油0.5mlをそれぞれ添加した。培養後、実施例1と同様にして得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表4にその結果を示す。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正内容】

【0055】

表 4

菌 株	M. アルピナ I FO8568		変異株 SAM1860	
	無	有	無	有
セサミン含有大豆油の添加	無	有	無	有
DGLA対ARAの比	0.15	1.17	5.04	12.3
総脂肪酸(g/L)	11.1	11.8	12.0	11.9
乾燥菌体(g/L)	23.8	24.2	24.6	24.1
DGLA生産量(g/L)	0.39	1.87	2.45	2.93

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正内容】

【0057】この結果から、「ビスホモγ-リノレン酸及びこれを含有する脂質の製造方法」と題する特許出願(特開平1-243992号)の明細書に記載されているのと同様の効果によって、ARAの生産が抑制されてDGLAの大量生産が起こり、DGLA対ARAの比が上昇することは明らかであり、セサミン以外に、ゴマ油、落花生油、ゴマ油に対して実質的に非混和性である有機溶剤によりゴマ油から抽出した抽出物、ゴマ種子の

溶剤抽出物、セサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン、タラゴン(Tarragon)の抽出物、イノンド種子(Dill Seed)の抽出物、パセリ(Parsley)の抽出物、ウコン(Turmeric)の抽出物、ナツメグ(Nutmeg)の抽出物も、ARAの生産を抑制しDGLAの大量

生産を起こして、DGLA対ARAの比が上昇すること

は明らかである。

【手続補正書】

【提出日】平成4年10月29日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】モリティエセラ属の変異株として例えば、本発明者ら条寄誘導した突然変異株モルティエセラ・アルピナSAM1860（微工研条寄第3589号）を使用することができる。本発明に使用される変異株を培養するためには、その菌株の孢子、菌糸、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固形培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られるものではない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正内容】

【0041】これらの菌体より、クロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いるBligh&Dyerの抽出法によって総脂質を抽出したところ、IFO8568から505mg、SAM1860から530mgの脂質が得られた。これらの脂質を無水メタノール-塩酸（95：5）を用いて50℃にて3時間処理することによってメチルエステル化し、エーテルで抽出してIFO8568から417mg、SAM1860から454mgの脂肪酸メチルを得た。得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。表1にその結果を示す。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C12P 7/64

C12R 1:80)

(C12P 7/64

C12R 1:66)

(54) PRODUCTION OF γ -LINOLENIC ACID

(11) 63-14695 (A) (43) 21.1.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-158649 (22) 8.7.1986
 (71) SUNTORY LTD (72) YOSHIJI SHINMEN(2)
 (51) Int. Cl.⁴ C12P7/64/(C12P7/64,C12R1:645)

PURPOSE: To obtain γ -linolenic acid by a simple process in high yield and inexpensively, by cultivating a microorganisms such as *Mortierella elongata*, etc., belonging to the genus *Mortierella* in a medium.

CONSTITUTION: *Mortierella elongata* SAM 0219 strain is inoculated into a medium containing 0.1~30wt% carbon source (e.g. glucose), 0.01~5wt% nitrogen source (e.g. meat essence), hydrocarbon, fatty acid (salt), etc., cultivated by aerated spinner culture method, etc. at pH 4~10 at 5~40°C for 2~10 days to form and accumulate lipid containing γ -linolenic acid in the cultivated mold. Then the prepared mold is separated and extracted with methanol to give a lipid compound of γ -linolenic acid. Then the compound is esterified with methanol, prepared methyl γ -linolenate is hydrolyzed with an alkali, extracted with an ether, etc., and purified.

(54) PRODUCTION OF BISHOMO γ -LINOLENIC ACID

(11) 63-14696 (A) (43) 21.1.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-158650 (22) 8.7.1986
 (71) SUNTORY LTD (72) YOSHIJI SHINMEN(2)
 (51) Int. Cl.⁴ C12P7/64/(C12P7/64,C12R1:645)

PURPOSE: To obtain bishomo- γ -linolenic acid (BLA) by a simple process in high yield and inexpensively, by cultivating a specific microorganism in a medium.

CONSTITUTION: *Mortierella elongata* SAM 0219 strain belonging to the genus *Mortierella*, capable of producing BLA, is inoculated into a medium containing 0.1~30wt% carbon source (e.g. glucose), 0.01~5wt% nitrogen source (e.g. peptone) and, if necessary, hydrocarbon, fatty acid (salt), fats and oils, etc., and cultivated by aerated spinner culture method, etc., at 5~40°C at 4~10pH for 2~10 days to form and accumulate BLA or lipid containing BLA in the mold. Then the mold is separated from the medium, the prepared mold is extracted with methanol, etc., to give a lipid compound of BLA. Then the compound is esterified with methanol, prepared BLA methyl ester is hydrolyzed with an alkali, extracted with an ether, etc., and purified.

(54) PRODUCTION OF EICOSAPENTAENOIC ACID

(11) 63-14697 (A) (43) 21.1.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-158651 (22) 8.7.1986
 (71) SUNTORY LTD (72) YOSHIJI SHINMEN(2)
 (51) Int. Cl.⁴ C12P7/64/(C12P7/64,C12R1:645)

PURPOSE: To obtain eicosapentaenoic acid (EPA) useful as thrombosis, etc., in expensively and in high yield, by cultivating a specific microorganisms in a medium.

CONSTITUTION: *Mortierella elongata* SAM 0219 strain capable of producing EPA is inoculated into a medium containing 0.1~30wt% carbon source (e.g. molasses), 0.01~5wt% nitrogen source (e.g. urea), hydrocarbon, fatty acid (salt), fats and oils, etc. Then, a mold is multiplied at optimum growth temperature of 20~30°C, subjected to shaking culture at 10~20°C at pH 4~10 for 2~10 days and lipid containing EPA in the mold is formed and accumulated. Then the mold is separated from the medium, collected and extracted with methanol, etc., to give a lipid compound of EPA. Then the compound is esterified with methanol, prepared EPA methyl ester is hydrolyzed with an alkali, extracted with an ether, etc., and purified.